

УДК 535.8:543.420.62;543.314;543.38;543.432

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ПОМОЩИ ФОТОАКУСТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И ТЕРМОЛИНЗОВОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Н.В.Орлова^{*,**}, А.В.Брусничкин^{*,**}, А.В.Фокин^{**}, О.Б. Овчинников^{**}, М.А.Проскурнин^{*}, С.В. Егерев^{**}

^{*}Московский Государственный университет им М.В.Ломоносова, химический факультет

119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, дом 1, строение 3

fluorl@mail.ru

^{**}Акустический институт им. Н.Н.Андреева

Поступила в редакцию 26 июня 2005 г.

Показана возможность определения липополисахаридов при помощи фотоакустической спектроскопии и термолинзовой спектроскопии в присутствии красителей, образующих с ними ионные пары (метилтимоловый синий). Пределы обнаружения липополисахаридов составили $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л для термолинзовой спектроскопии и $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л для фотоакустической спектроскопии.

Орлова Наталья Викторовна – младший научный сотрудник Акустического института им. Н.Н.Андреева, аспирант 3-го года обучения химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

Область научных интересов: термолинзовая спектроскопия, методы молекулярной абсорбционной спектроскопии, анализ лекарственных препаратов на примеси, физико-химические исследования.

Автор 18 опубликованных работ.

Брусничкин Антон Витальевич – младший научный сотрудник Акустического института им. Н.Н. Андреева, аспирант 1-го года обучения химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

Область научных интересов: термолинзовая спектроскопия, методы молекулярной абсорбционной спектроскопии, анализ лекарственных препаратов на примеси, физико-химические исследования.

Автор 7 опубликованных работ.

Фокин Андрей Викторович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Акустического института им. Н.Н.Андреева.

Область научных интересов: оптоакустика, физическая акустика, неоднородные среды. Автор 20 опубликованных работ.

Овчинников Олег Борисович – научный сотрудник Акустического института им. Н.Н.Андреева.

Область научных интересов: оптоакустика, физическая акустика, неоднородные среды, компьютерное моделирование, методы фотоакустической диагностики.

Автор 30 опубликованных работ.

Проскурнин Михаил Алексеевич – кандидат химических наук, научный сотрудник, руководитель группы термолинзовой спектроскопии Химического факультета МГУ.

Область научных интересов: методы лазерной термооптической и фототермической спектроскопии, комплексообразование переходных металлов в растворах, анализ следов, математическая обработка результатов анализа, методы проточного анализа и хроматографии, сорбция, экстракция.

Автор 130 опубликованных работ.

Егерев Сергей Викторович – профессор, доктор физико-математических наук, заместитель директора по научной работе Акустического института им. Н.Н.Андреева.

Область научных интересов: оптоакустика, физическая акустика, неоднородные среды, изучения физики взаимодействия мощного лазерного излучения с веществом с целью создания мощных источников звука для задач прикладной гидроакустики.

Автор 350 опубликованных работ.

Актуальной задачей современного фармацевтического анализа является разработка методик определения пирогенов [1, 2]. Наиболее часто под этим термином понимают эндотоксины, локализованные в наружной мембране грамотрицательных бактерий [3, 4], которые с химической точки зрения являются липополисахаридами (ЛПС). Наличие эндотоксинов в организме в следовых количествах кроме пирогенной реакции (повышения температуры тела) вызывает другие острые эффекты: лихорадку, диарею, гипотензию, внутрисосудистое свертывание крови [5, 6].

В настоящее время эндотоксины определяют при помощи тестов на животных или при помощи биологических тестов (прежде всего, ЛАЛ-теста с использованием вытяжек из крови мечехвоста [3, 4]). Эти методы либо не обеспечивают высокой чувствительности, либо не имеют достаточной селективности определения. С другой стороны, потенциально более селективные химические методы определения ЛПС мало разработаны и ограничиваются спектрофотометрическим определением, не обеспечивающим достаточной чувствительности определения пирогенов.

Ранее мы показали, что термолинзовая спектрометрия как один из высокочувствительных методов молекулярной спектроскопии [7, 8] может быть использована для фотометрического определения липополисахаридов на микрограммовом уровне, что позволяет увеличить чувствительность спектрофотометрических методик как минимум на порядок и обеспечить необходимый

уровень чувствительности для определения пирогенных веществ в реальных объектах. Представляется интересным расширить число реакций, используемых для термолинзового определения ЛПС. С другой стороны, фотоакустическая спектроскопия [9] как еще один высокочувствительный метод молекулярной спектроскопии поглощения также удовлетворяет необходимым требованиям по чувствительности определения ЛПС в реальных объектах [10]. В результате задачей данной работы была разработка методик определения липополисахаридов методом фотоакустической спектроскопии и термолинзовой спектрометрии по реакциям образования ионных пар с катионными красителями.

Экспериментальная часть

Вспомогательные измерения. Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр Shimadzu UVmini-1240CE, Япония. Измерения проводили на длине волны 540 нм. Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути $l = 1$ см. Для измерений pH среды использовали универсальный иономер ЭВ-74 с водородным индикаторным электродом и хлорид-серебряным электродом сравнения. Точность измерения $\text{pH} \pm 0,05$.

Термолинзовые измерения. Использована установка лазерного термолинзового спектрометра [11]. Термолинза индуцируется в кварцевой кювете (длина оптического пути $l = 1$ см) излучением Ag^+ лазера Innova 90-6 (Coherent, США) с

Таблица 1
Экспериментальные параметры для конфигурации двухлучевого термолинзового спектрометра

Индуктирующий лазер	Длина волны; λ_e , нм	514,5
	Фокусное расстояние фокусирующей линзы; f_e , мм	300
	Конфокальное расстояние; Z_{ce} , мм	22
	Мощность лазера в ячейке; P_e , мВт	80 – 1500
	Диаметр поперечного сечения луча лазера в перетяжке; ω_{oe} , мкм	60
Зондирующий лазер	Длина волны; λ_p , нм	632,8
	Фокусное расстояние фокусирующей линзы; f_p , мм	185
	Конфокальное расстояние; Z_{cp} , мм	3,1
	Мощность лазера в ячейке; P_p , мВт	3
	Диаметр поперечного сечения луча лазера в перетяжке; ω_{op} , мкм	25
Другие параметры	Длина оптического пути при измерении жидких образцов; l , мм	10,1
	Расстояние между ячейкой и детектором; см	180
	Соотношение площадей поперечного сечения зондирующего и индуцирующего лучей в кювете	2,0
	Относительное расстояние от перетяжки индуцирующего лазера до кюветы	3,1
	Частота прерывания; ψ , Гц	2,5

длиной волны $\lambda = 514,5$ нм (TEM_{00} -мода, мощность в кювете с образцом 100 мВт). В качестве зондирующего лазера использован He-Ne лазер SP-106-1 (Spectra Physics, США), с длиной волны 632,8 нм (TEM_{00} -мода, $P_{\max} = 10$ мВт) (табл. 1). Сигнал (интенсивность в центре пробного луча) с фотодиода подается на плату АЦП-ЦАП компьютера типа IBM PC/AT. Синхронизация процесса измерений осуществляется компьютером при помощи специальной программы [11]. Относительное стандартное отклонение измерений на спектрометре 0,01–0,02.

Фотоакустические измерения. Источником светового импульса являлся лазер на АИГ: Nd^{+3} с каскадным умножителем частоты во вторую гармонику (длина волны $\lambda = 0,53$ мкм). Энергия в импульсе гармоники измерялась с помощью измерителя средней мощности и энергии лазерного излучения ИМО-2М и составляла 15 мДж.

Частота следования импульсов была равна 0,5 Гц. При проведении эксперимента контроль энергии осуществлялся фотодиодом, предварительно откалиброванным для длины волны $\lambda = 0,53$ мкм при указанной энергии. Лазерный луч проходил через центр ячейки, а в 15 мм от луча помещался пьезодатчик (чувствительность – 20 мкВ/Па, полоса 1 МГц). Сигнал регистрировался первым каналом цифрового осциллографа С9-8. Для контроля энергии использовался второй канал осциллографа. Запуск лазера осуществлялся импульсами с генератора Г5-60 (5 В, 20 мкс, 0,5 Гц). Синхронизация осциллографа обеспечивалась передним фронтом импульса с фотодиода. После каждого импульса данные через интерфейсы КОП поступали в компьютер, где обрабатывались и записывались на жесткий диск в виде текстового файла. Схема экспериментальной установки представлена на рис. 1.

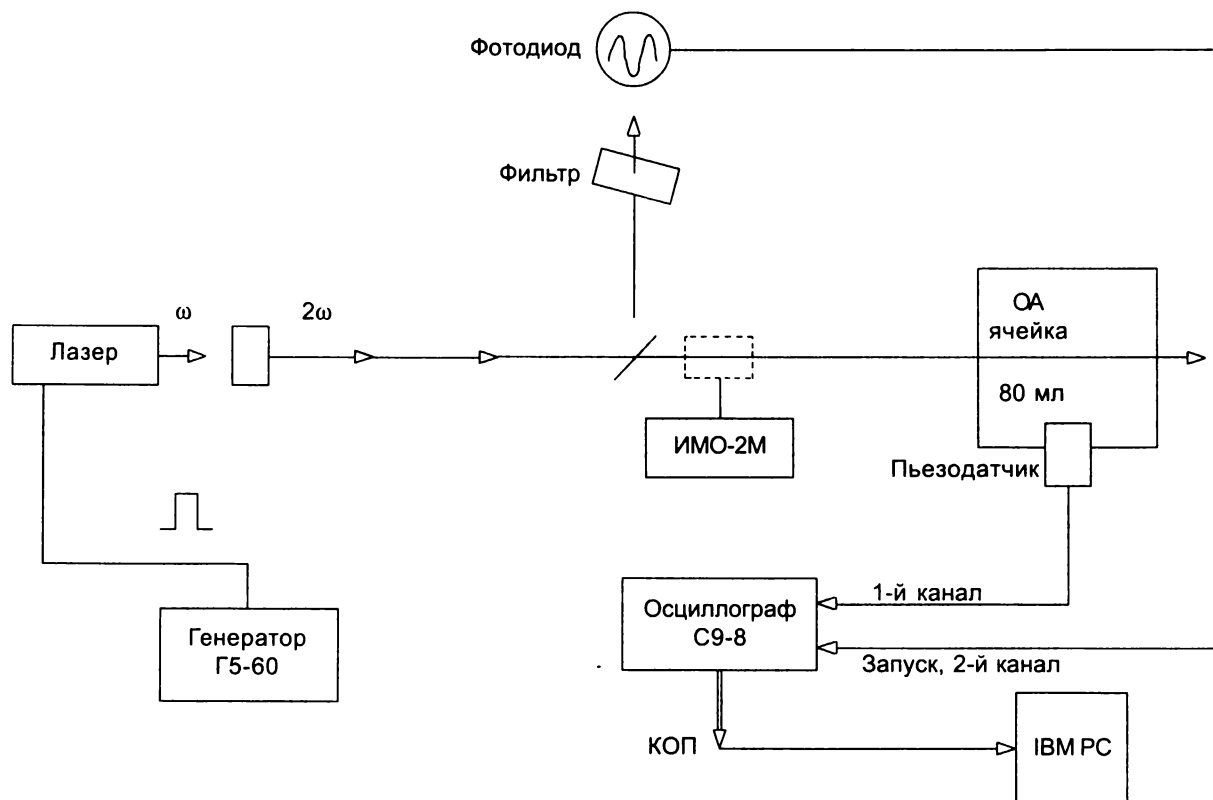


Рис.1. Схема установки для фотоакустического определения липополисахаридов.

Реагенты и растворители. В работе использовали следующие реагенты: гидроксид натрия (водный раствор), ч.д.а.; натрий углекислый безводный, ч.д.а.; краситель метилтимоловый синий, Chemapol, х.ч.; карбоцианиновый краситель, Merck, х.ч.; эриохромцианин R, Chemapol, х.ч.; пирокатехиновый фиолетовый, Союзреактив, х.ч.; бактериальная культура липополисахарида, выделенная из *Salmonella typhi* 110, пр-ва

завода Бактериальных препаратов им Н.Ф. Гамалеи, Москва. Все растворы готовили непосредственно перед экспериментом. Для приготовления растворов использовали свежеперегнанную дистиллированную воду. Взвешивания проводили на аналитических весах с точностью до 0,1 мг. Стеклолабораторную посуду и кюветы вымачивали в концентрированной азотной кислоте и промывали дистиллированной водой.

Методики.

Спектрофотометрическое определение липополисахаридов. К 1 мл раствора ЛПС в водном растворе карбоната натрия (рН 11) с концентрацией $(2 - 10) \cdot 10^{-8}$ моль/л прибавляют водный раствор метилтимолового синего ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и доводят общий объем раствора до 4 мл раствором карбоната натрия (рН 11). Измеряют оптическую плотность при длине волны 585 нм (в максимуме полосы поглощения окрашенного соединения). Контрольный опыт готовят аналогично, но вместо липополисахарида добавляют раствор карбоната натрия (рН 11). По полученным данным строят градуировочную зависимость оптической плотности от концентрации ЛПС и используют ее при анализе образцов неизвестной концентрации.

Термолинзовое определение липополисахаридов. К 1 мл раствора ЛПС в водном растворе карбоната натрия (рН 11) с концентрацией $(2 - 10) \cdot 10^{-8}$ моль/л прибавляют водный раствор метилтимолового синего ($1,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и доводят общий объем раствора до 4 мл раствором карбоната натрия (рН 11). Измеряют термолинзовый сигнал при 514,5 нм ($P_c = 95$ мВт). Контрольный опыт готовят аналогично, но вместо ЛПС добавляют раствор карбоната натрия (рН 11). По полученным данным строят градуировочную зависимость оптической плотности от концентрации ЛПС и используют ее при анализе образцов неизвестной концентрации.

Фотоакустическое определение липополисахаридов в отсутствие красителя. В кювету для фотоакустических измерений (длина оптического пути $l = 4$ см) приливают 8 мл водного раствора ЛПС ($4 \cdot 10^{-8}$ моль/л). Доводят общий объем раствора до 80 мл фильтрованной дистиллированной водой. Измеряют фотоакустический сигнал (длина волны $\lambda = 532$ нм, энергия лазерного излучения 15 мДж), число усреднений 300.

Фотоакустическое определение липополисахаридов с метилтимоловым синим. В кювету для фотоакустических измерений (длина оптического пути $l = 4$ см) приливают 8 мл раствора ЛПС ($4 \cdot 10^{-8}$ моль/л) в водном растворе карбоната натрия (рН 11). Добавляют 2 мл раствора метилтимолового синего с концентрацией $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Доводят общий объем раствора до 80 мл раствором карбоната натрия (рН 11). Измеряют фотоакустический сигнал (длина волны $\lambda = 532$ нм, энергия лазерного излучения 15 мДж), число усреднений 100. Определяют амплитуду сигнала и строят градуировочный график.

Результаты и их обсуждение

Использование в качестве катионного красителя для образования ионных пар предложенного в литературе индикатора хинальдинового синего [12] невозможно из-за его малой доступности и высокой цены коммерческих препаратов. Поэтому провели поиск среди аналогичных ему доступных катионных красителей трифенилметанового ряда. В результате выбраны следующие красители: эриохромцианин R, метилтимоловый синий, пирокатехиновый фиолетовый. При реакции с красителями эриохромцианином R и пирокатехиновым фиолетовым образования ионных пар не наблюдалось, спектры чистых растворов красителей и растворов, содержащих ЛПС, совпали. Напротив, как видно из рис. 2, при реакции образования ионных пар между липополисахаридом и метилтимоловым синим происходит увеличение оптической плотности в максимуме полосы поглощения красителя. Таким образом, в дальнейшей работе использовали метилтимоловый синий.

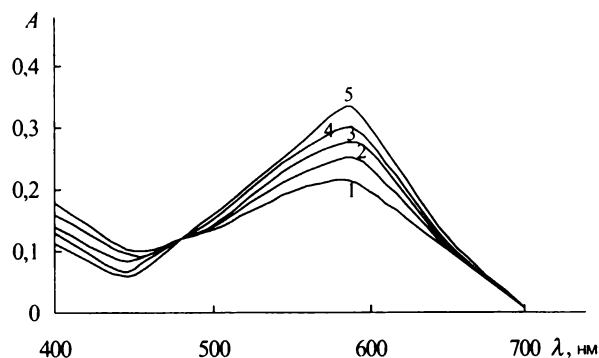


Рис. 2. Спектры поглощения продуктов образования ионных пар ЛПС и метилтимолового синего ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) в среде 0,2 М карбоната натрия. Концентрация ЛПС равна, соответственно: 1 – 0, 2 – 10^{-7} моль/л, 3 – $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 4 – $3 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 5 – $3,8 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Спектрофотометрическое определение ЛПС по реакции с метилтимоловым синим.

Известно [15], что метилтимоловый синий находится в необходимой для образования ионных пар с ЛПС в форме (H_2Ind) при рН 11 (синяя форма). Все измерения проводили в присутствии 0,2 М карбоната натрия для поддержания необходимого значения рН. Проведена оценочная характеристика образующихся по реакции ионных пар в интервале длин волн 400 – 700 нм. При постоянной концентрации красителя в среде варьировали количество ЛПС в пределах $n \cdot 10^{-7} - n \cdot 10^{-8}$ моль/л. Максимум полосы поглощения полученного окрашенного соединения для всех растворов находится на длине волны 585 нм (рис. 2). Увеличение концентрации ЛПС в среде приводит к линейному

росту оптической плотности на длине волны, соответствующей максимуму полосы поглощения красителя. Это позволило применять для определения липополисахаридов метод градуировочного графика.

Для обеспечения полного протекания реакции концентрацию красителя брали с десятикратным избытком по отношению к ЛПС. С целью снижения сигнала контрольного опыта варьировали концентрацию красителя в среде, исходя из предположения, что только один мономер в повторяющейся полисахаридной цепочке ЛПС образует ионную пару с одной молекулой красителя [16]. В результате выбрали концентрацию красителя $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Уравнение градуировочного графика в максимуме полосы поглощения ионных пар при 585 нм:

$$A = (3,43 \pm 0,18) \cdot 10^5 c + (4,8 \pm 1,2) \cdot 10^{-3}, \\ r = 0,9910, n = 24, P = 0,95$$

(с – концентрация ЛПС, моль/л); предел обнаружения (по 3σ-критерию) составил $2 \cdot 10^{-8}$ моль/л. Для дальнейшего сравнения с термолинзовыми измерениями получено уравнение градуировочного графика для длины волны 514,5 нм:

$$A = (2,74 \pm 0,15) \cdot 10^5 c + (3,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}, \\ r = 0,9962, n = 25, P = 0,95$$

предел обнаружения $3 \cdot 10^{-8}$ моль/л, диапазон определяемых содержаний $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, воспроизводимость измерений в этом диапазоне не ниже 5%. В целом, чувствительность спектрофотометрической методики достаточно высока для перехода к термолинзовым измерениям.

Термолинзовое определение липополисахаридов по образованию ионных пар с метилтимоловым синим. Выбор длины волны термолинзового спектрометра (514,5 нм) обусловлен ее близостью к максимуму полосы поглощения ионных пар ЛПС и красителя метилтимолового синего. Исследовали устойчивость метилтимолового синего к воздействию лазерного излучения. В качестве модельного раствора использовали растворы красителя в среде 0,2 М карбоната натрия (от $5,0 \cdot 10^{-7}$ до $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Для всех исследуемых растворов наблюдался стабильный устойчивый сигнал при облучении лазерным излучением при длине волны $\lambda_c = 514,5$ нм и мощности лазерного излучения $P_c = 300$ мВт.

Уравнение зависимости термолинзового сигнала от концентрации красителя при длине волны 514,5 нм имеет вид (мощность лазерного излучения $P_c = 128$ мВт):

$$\vartheta = (8,7 \pm 0,4) \cdot 10^4 c + (1,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-2}, \\ r = 0,9933, n = 16, P = 0,95$$

(с – концентрация красителя, моль/л). По полученной градуировочной зависимости выбрана концентрация красителя, $1,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, так как она обеспечивает уровень термолинзового сигнала, высокую чувствительность, хорошую инструментальную воспроизводимость термолинзовых измерений ($s_r = 0,01 \pm 0,02$) и достаточное изменение сигнала при образовании ионных пар с ЛПС.

Провели определение ЛПС при помощи термолинзовой спектрометрии. Уравнение градуировочного графика при длине волны 514,5 нм (мощность лазерного излучения $P_c = 128$ мВт):

$$\vartheta = (1,67 \pm 0,08) \cdot 10^6 c + (3 \pm 2) \cdot 10^{-2}, \\ r = 0,9967, n = 21, P = 0,95$$

(с – концентрация ЛПС, моль/л); предел обнаружения составил $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л, диапазон определяемых содержаний от $5 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, относительное стандартное отклонение измерений в этом диапазоне не ниже 6%. Таким образом, применение термолинзовой спектрометрии позволяет снизить предел обнаружения и нижнюю границу определяемых содержаний ЛПС более чем на порядок по сравнению с традиционной спектрофотометрией.

В целом, предложенная методика в ее спектрофотометрическом и термолинзовом вариантах может быть использована для определения ЛПС из их чистых растворов. Показано, что при определении ЛПС метилтимоловый синий может заменить часто упоминающийся в литературе хинальдиновый синий, использование которого затруднительно из-за его малой доступности и дороговизны.

Фотоакустическое определение липополисахаридов. В фотоакустических экспериментах исследовали разницу акустических откликов чистой воды и растворов ЛПС под действием лазерного излучения, вызванных влиянием ЛПС как высокомолекулярных соединений на характеристики среды. Эксперименты поставлены в двух вариантах: в отсутствие красителя и, аналогично спектрофотометрическому и термолинзовому определению, с красителем, образующим ионные пары с ЛПС (для одновременного увеличения коэффициента поглощения растворов и, следовательно, интенсивности сигнала, а также появления сигнала, вызванного химическим взаимодействием в системе). Анализ сигнала (число усреднений $n = 50 \div 500$) проводили по ам-

плитуде и частотам колебаний фотоакустического сигнала [10, 14].

Фотоакустическое определение липополисахаридов в отсутствие красителя. Очевидно, что наиболее привлекательным вариантом фотоакустического определения ЛПС является такой, в котором не используются дополнительные реагенты. Поэтому провели исследование сигналов чистой воды и растворов ЛПС в отсутствие красителя. Воду, используемую для анализа, предварительно фильтровали для удаления пыли и других взвесей, так как эти частицы вносят свой вклад в акустический сигнал раствора. Сигнал чистой фильтрованной воды находился на уровне шума (рис. 3).

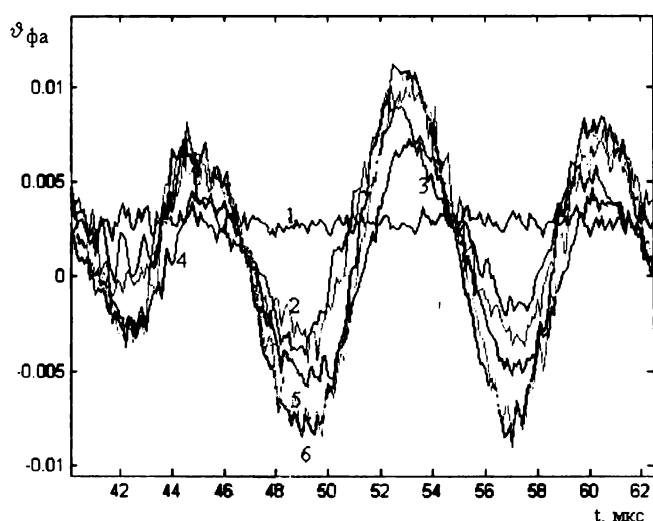


Рис.3. Усредненный фотоакустический сигнал: 1 — сигнал фильтрованной дистиллированной воды с перекрытым лучом; 6 и 5 — сигнал фильтрованного раствора ЛПС, $c = 2 \cdot 10^{-7}$ моль/л (до фильтрации); 6 — сигнал зарегистрирован сразу, 5 — спустя 30 мин; 3 — сигнал фильтрованной дистиллированной воды; 4 — сигнал фильтрованной дистиллированной воды; 2 — сигнал нефилтрованной дистиллированной воды.

Для выбранного режима фотоакустических измерений предел обнаружения рассчитывают как минимальную концентрацию определяемого соединения, обеспечивающую значимое (15%) изменение сигнала фона [13, 14]. В результате фотоакустический предел обнаружения ЛПС составил $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л. Различие средних сигналов воды и водных растворов липополисахаридов с меньшими концентрациями незначимо. Нижняя граница определяемых содержаний (соотношение сигналов пиков в присутствии липополисахаридов и в их отсутствие 1,25) составила $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Таким образом, показана принципиальная возможность способа фотоакустического определения ЛПС по их влиянию на характеристики среды, хотя его чувствительность оказалась недостаточна для задач фармацевтического

анализа.

Фотоакустическое определение липополисахаридов с красителями, образующими ионные пары. Поскольку основной задачей на данном этапе работы являлось обнаружение селективных различий сигнала в фотоакустической системе в отсутствие и присутствии ЛПС, методики термолинзового определения перенесли на фотоакустический эксперимент практически без изменений. Концентрацию метилтимолового синего варьировали в пределах $1,0 \cdot 10^{-7}$ до $8,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л. В качестве оптимальной выбрана концентрация $4,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л. При добавлении красителя к воде и ЛПС соотношение сигналов ЛПС : фон (дистиллированная апиrogenная вода) увеличилось в полтора раза по сравнению с отсутствием красителя. Анализ фотоакустических данных позволил нам заключить, что рост сигнала вызван именно ростом суммарной оптической плотности растворов, а не реакцией образования ионных пар, то есть метилтимоловый синий в фотоакустических исследованиях ЛПС выступает как инертный компонент.

В результате предел обнаружения составил $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, нижняя граница определяемых содержаний — $2 \cdot 10^{-8}$ моль/л. Верхнюю границу определяемых содержаний не оценивали, однако определение ЛПС на уровне $n \cdot 10^{-7}$ моль/л характеризуется относительным стандартным отклонением порядка 2 %. В целом, фотоакустическая спектроскопия может быть использована для определения ЛПС на уровне содержания $n \cdot 10^{-8} + n \cdot 10^{-7}$ моль/л. При этом чувствительность определения по сравнению с традиционной спектрофотометрией возрастает в четыре раза. Таким образом, хотя чувствительность фотоакустического определения ЛПС уступает термолинзовому варианту, она приближается к характеристикам, требуемым в фармацевтическом анализе. Кроме того, фотоакустический и термолинзовый методы фактически дополняют друг друга: термолинзовая спектрометрия регистрирует образования ионных пар краситель–ЛПС, в то время как фотоакустическая спектроскопия позволяет зафиксировать изменение оптоакустических характеристик водной среды в присутствии ЛПС. Таким образом, совместное использование обоих методов существенно увеличивает селективность определения ЛПС, так как поглощающие соединения, мешающие в термолинзовой спектрометрии, не влияют на фотоакустические измерения и наоборот, компоненты, влияющие на оптоакустические параметры воды (например, белки), не сказываются на термолин-

зовом определении.

Наиболее важной частью данной работы мы считаем то, что показана принципиальная возможность определения ЛПС по их влиянию на параметры среды в фотоакустическом эксперименте, а также возможность как термолинзового, так и фотоакустического детектирования ионных

пар ЛПС с катионными красителями на уровне $n \cdot 10^{-8} - n \cdot 10^{-7}$ моль/л, что ранее не было достигнуто. Это позволяет рассчитывать на появление в ближайшем будущем новых высокочувствительных методов определения пирогенных веществ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 03-02-17333).

ЛИТЕРАТУРА

1. Яровая Л.М. Новые данные о химической структуре липополисахаридов и практические перспективы / Л.М.Яровая, В.А.Алешин // Журнал микробиологии. 1991. № 2. С.73-78.
2. Долгова Г.В. Испытание на пирогенность (проект общей статьи для Фармакопеи XII) / Г.В.Долгова, Г.Я.Кивман, Н.П.Неугодова, А.С.Рыков, З.Н.Еникеева // Фарматека. 1999. № 3. С.21-23.
3. Сидоренко С.В. Место бактерий в живой природе / / Инфекции и антимикробная терапия. 2000. Т.2, №2. С.23-25.
4. Ситников А.Г. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. / А.Г.Ситников, Л.А.Травина, В.Л.Багирова / М.: ЦНИИИ. 1997.
5. Bacterial Endotoxins Test, USP, 24 – NF 19 through Suppl. 3. P. 85.
6. Test for Bacterial Endotoxins, British Pharmacopeia, Vol. II, App. XIV C.
7. Dovichi N.J /Thermo-optical spectrometry in analytical chemistry / CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 1987. V.17. P.357-423.
8. Гришко В.И. Лазерная аналитическая термолинзовая спектроскопия / В.И.Гришко, В.П.Гришко, И.Г.Юделевич / Новосибирск: Ин-т неорг. хим. СО РАН. 1992. С.322.
9. Жаров В.П. Лазерная оптико-акустическая спектроскопия. / В.П.Жаров, В.С.Летохов / М.: Наука. 1984.
10. Photoacoustic and Photothermal Phenomena III. Ed. D.Bicanic. Springer Series in Optical Sciences. 1992. V.69. P.50.
11. Проскурнин М.А. Двухлазерный термолинзовый спектрометр для проточного анализа. / М.А.Проскурнин, А.Г.Аброскин, Д.Ю.Радужкевич / Журн. аналит. химии. 1999. Т.54. № 1. С.101 - 108.
12. Dubois M.A colorimetric method for the determination of sugars / M.Dubois, K.Gilles, J.KHamilton, P.A.Rebers, F.Smith / Nature. 1951. V. 168. P. 167 -171.
13. Гусев В.Э. Лазерная оптоакустика / В.Э.Гусев, А.А.Карабутов / М.Наука. 1991.
14. Егев С.В. Импульсная оптоакустика жидкостей / Дисс. докт. физ.-мат. наук. М. 1994.
15. Laidlaw R.A. Filter-paper chromatography: extraction of sugars from the paper at room temperature. / R.A.Laidlaw, S.G.Reid / Nature. 1950. V.166. P.476 - 477.
16. Soedjak H.S. Colorimetric determination of carageenans and other anionic hydrocolloids with methylene blue / Anal. Chem. 1994. V.66. P.4514 -4518.

* * * * *

DETERMINATION OF LIPOPOLYSACCHARIDES BY PHOTOACOUSTIC SPECTROSCOPY AND THERMAL LENS SPECTROMETRY.

N.V.Orlova, A.V.Brusnichkin, A.V.Fokin, O.B.Ovchinnikov, M.A.Proskurnin, S.V.Egerev

The principal potential of the determination of lipopolysaccharides by photoacoustic spectroscopy and thermal lens spectrometry by ion-pair formation with Methyl Thymol Blue dye was shown. The limits of detection of lipopolysaccharides were $2 \cdot 10^{-9}$ mol for thermal lens spectrometry and $1 \cdot 10^{-8}$ for photoacoustic spectroscopy.